

## 明細書

### 免疫応答システムを利用したドラッグデリバリーシステム

#### 技術分野

本発明は、オリゴ糖被覆リポソームを用いたドラッグデリバリーリポソーム組成物に関する。より詳細には、本発明は、腹腔内に投与した際に腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達されることを特徴とする、オリゴ糖被覆リポソームを用いたドラッグデリバリーリポソーム組成物に関する。

#### 背景技術

癌の術後の再発は癌患者の生存率の向上を阻む最大の障壁となっており、この再発を抑制することは癌の臨床上最も重要な課題の一つである。根治手術後の再発の主たる原因は手術時に既に撒布されている遊離癌細胞あるいは目に見えない微小転移によると考えられており、この微小転移を検出して治療することは、癌患者の予後に直結する重要な課題である。胃癌では、根治手術後の再発形式として腹膜再発が50%以上を占め、患者の予後を決める最も重要な因子である。現在の Golden standard、腹腔洗浄細胞診による細胞診陽性の診断は予後不良を意味する。

しかしながら、細胞診陰性の症例からの腹腔再発が少なからず見られるなど、上記の方法は検出感度が低く、腹膜微小転移の検出は事実上不可能である。これまでの所、癌胎児抗原（CEA）を指標とするRT-PCR法を用いた腹腔内遊離癌細胞の高感度の検出法が確立されている。また、1995年から臨床検体を用いた解析を8年に渡って行った結果、腹膜再発のリスクの高さが生命予後に直結していることが明らかになっている。現在、高度先進医療として、腹腔内再発のリスク評価を行うとともに、胃癌患者の予後改善のための治療法の開発が検討されている。

一方、抗癌剤の投与に際して、リポソームは、より選択的に癌局所へ抗癌剤を

到達させ、治療効果を高めると同時に正常組織への集積を抑えることで副作用の軽減を図る目的で用いられている。血管内に投与されたリポソームは、血管透過性の亢進した腫瘍血管では癌組織中に漏れ出し、局所に滞留する性格を有している。従って、薬剤送達システムとしては、passive targeting と呼ばれるものである。一方、抗体などの特異的結合能を利用した薬剤送達システムは active targeting と呼ばれている。従来の方法はリポソームを直接、癌細胞へ到達させることを目的としている。この場合、リポソームは、血中のマクロファージには取り込まれないようにしつつ血行性に癌部に送達することを目的として、開発されてきた。

#### 発明の開示

上記の通り、腹膜微小転移の有無の検出は可能になりつつあるが、腹膜微小転移の局所を特定する方法は存在しない。胃癌の臓腹腔内転移は、乳斑と呼ばれる大網や散在する腸間膜の節外性小リンパ節を足がかりとして生じることが臨床的に知られている。本発明者らはこれまでに、GFP遺伝子を導入した転移性細胞と、簡便なGFP検出システムを組み合わせることにより、乳斑に生じてくる微小転移を非侵襲的に可視化できる微小転移マウスモデルを確立し、微小転移が大網や腸管膜リンパ節に生じてくることを見出し、さらにマウスを用いた実験で初期腹腔内転移の早期に抗癌剤を投与すると有効であることを見出している。しかし、腹腔という広い空間に薬剤を投与すると薬剤の有効濃度に至らない、あるいは有効濃度に維持しようとするれば非常に高濃度の薬剤を投与することとなり、薬剤の血中移行など副次的な問題が生じるため、現時的ではなく、有効な投与方法がないのが現状である。従って、腹膜微小転移相という局所にドラッグデリバリーシステムで薬剤を集中させることができれば、有効な投与方法となりうる。即ち、本発明は、抗癌剤などの投与物質を標的部位に効率良く集積させることができるドラッグデリバリー組成物を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、オリゴマンノース

で被覆したリポソームを腹腔内に投与すると、非常に特異的かつ迅速に腹腔内常在性マクロファージによって取り込まれることを見出した（図1）。また、このオリゴマンノース被覆リポソームを特異的に取り込んだマクロファージが12時間から24時間という短時間で初期腹腔内転移の生じる局所である乳斑と呼ばれる大網や腸管膜リンパ節に散在する節外性リンパ節に集積することを見出した（図2）。また、実際に腹腔内におけるオリゴマンノース被覆リポソームを取り込んだマクロファージの集積場所と癌細胞の微小転移の生じる場所が同じであることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、オリゴ糖被覆リポソームと投与物質とを含む、投与物質を標的部位に送達するためのドラッグデリバリーリポソーム組成物が提供される。

好ましくは、オリゴ糖はオリゴマンノースであり、さらに好ましくは、オリゴ糖はマンノペンタオース又はマンノトリオースである。

好ましくは、投与物質は、薬物、マーカーまたは造影剤である。

好ましくは、薬物は抗癌剤である。

好ましくは、本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物は、腹腔内に投与され、腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達される。

好ましくは、標的部位は、腹腔内の節外性小リンパ組織又は腸管膜リンパ組織である。

好ましくは、本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物は、磁性化合物を封入したオリゴ糖被覆リポソームと一緒に組み合わせて投与される。

本発明の別の側面によれば、オリゴ糖被覆リポソームと投与物質とを含むドラッグデリバリーリポソーム組成物をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、投与物質を標的部位に送達する方法が提供される。

好ましくは、本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物は、磁性化合物を封入したオリゴ糖被覆リポソームと一緒に組み合わせてヒトを含む哺乳動物に投与し、その後、外部から磁場を照射することができる。

## 図面の簡単な説明

図 1 は、M3-DPPE 被覆リポソームと M3-DPPE で被覆していないリポソームをマウスに投与して、1 時間後に細胞を回収し腹腔内細胞（F 4 / 8 0 陽性細胞）への取込みを観察した結果を示す。

図 2 は、大網への M3-DPPE 被覆リポソームの集積を経時的に観察した結果を示す。

図 3 は、大網内への抗癌剤封入糖鎖被覆リポソームと磁性微粒子封入糖鎖被覆リポソームの至適取り込み条件を調べた結果を示す。

図 4 は、抗癌剤（5FU）を投与したマウスと投与しないマウスを開腹しがんの増殖を GFP の蛍光を指標に観察した結果を示す。

図 5 は、抗癌剤（5FU）を投与したマウスと投与しないマウスを開腹しがんの増殖を GFP の蛍光を指標に観察した結果を示す。

図 6 は、抗癌剤（5FU）を投与したマウスと投与しないマウスを開腹しがんの増殖を GFP の蛍光を指標に観察した結果を示す。

## 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について具体的に説明する。

本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物は、オリゴ糖被覆リポソームと投与物質とを含むことを特徴とするものであり、投与物質を標的部位に送達するために使用される。さらに具体的には、本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物は、腹腔内に投与された場合に、腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達される。本発明における標的部位は、好ましくは、癌の初期腹腔内転移病巣である大網や腸管膜の節外性小リンパ組織である。

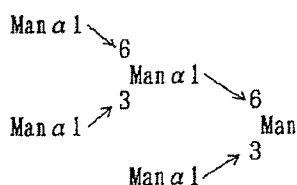
本発明で用いるオリゴ糖被覆リポソームとしては、例えば、特許第 2 8 2 8 3 9 1 号公報に記載のリポソームを用いることができる。オリゴ糖を構成する糖成分の種類は特に限定されないが、例えば、D-マンノース（D-M a n）、L-

フコース (L-F u c)、D-アセチルグルコサミン (D-G l c N A c)、D-グルコース (D-G l c)、D-ガラクトース (D-G a l)、D-アセチルガラクトサミン (D-G a l N A c)、D-ラムノース (D-R h a) などが挙げられる。

オリゴ糖中で、各構成糖は、 $\alpha 1 \rightarrow 2$  結合、 $\alpha 1 \rightarrow 3$  結合、 $\alpha 1 \rightarrow 4$  結合、 $\alpha 1 \rightarrow 6$  結合又は  $\beta 1 \rightarrow 4$  結合等あるいはこれらの組合せにより結合している。例えば、マンノースは上記の結合により単鎖を構成してもよく、又は  $\alpha 1 \rightarrow 3$  結合と  $\alpha 1 \rightarrow 6$  結合との組合せにより分枝構造をとってもよい。オリゴ糖中の単糖の数は、好ましくは2～11個である。具体的なオリゴ糖として、例えばマンノビオース (M a n 2)、マンノトリオース (M a n 3)、マンノテトラオース (M a n 4)、マンノペンタオース (M a n 5)、マンノヘキサオース (M a n 6)、マンノヘプタオース (M a n 7)、種々の混合オリゴ糖、例えば下記に示すM5 (式1) 及びRN (式2) 等を挙げるができる。

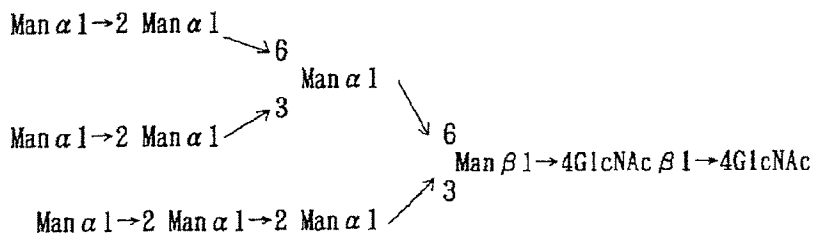
式1

M5



式2

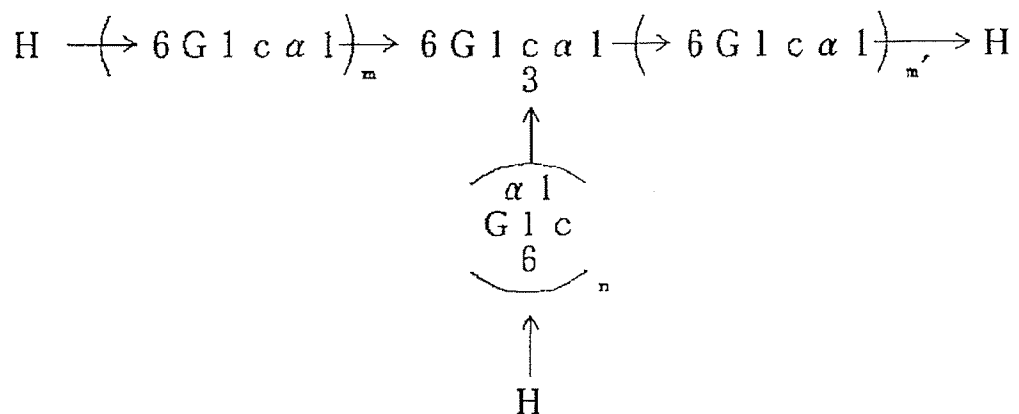
RN



(式中、 $\alpha 1 \rightarrow 2$  結合しているManは、それぞれ独立に、存在してもよく存在しなくてもよい。)

さらに、グルコースを含有するオリゴ糖として式3に示す構造を有するものを挙げることができ、N-アセチルグルコサミンを含むオリゴ糖として式4に示すものを挙げる事ができ、そしてフコースを含むオリゴ糖として式5に示すものを挙げる事ができる。

式3

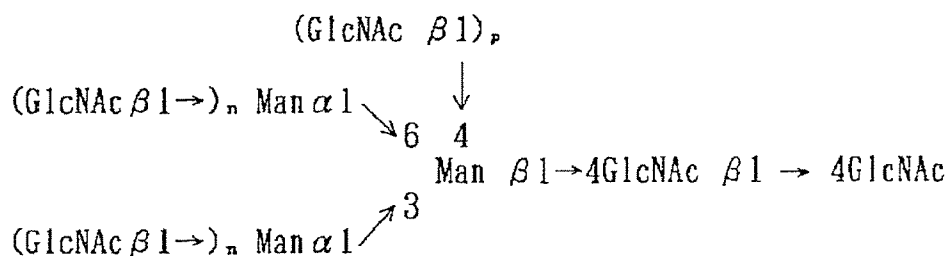


( $m + m' + n$  は 1 ~ 10)

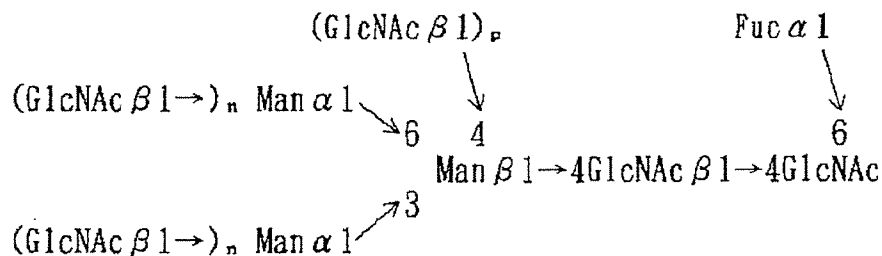
式4



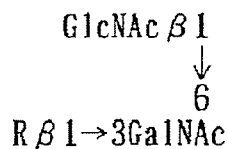
(n は 0 ~ 4)



(p は 0 又は 1 であり、n はそれぞれ独立に 0 ~ 3 である。式中右側の 4GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  4GlcNAc で示した 2 つの GlcNAc 残基は、それぞれ独立にあってもなくてもよい。また、(GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$ )<sub>n</sub> で示した GlcNAc はどれも右隣の Man の空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)

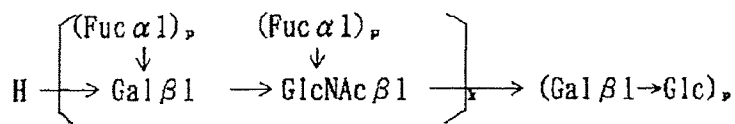


(p は 0 又は 1 であり、n はそれぞれ独立に 0 ~ 3 である。また、(GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$ )<sub>n</sub> で示した GlcNAc はどれも右隣の Man の空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)

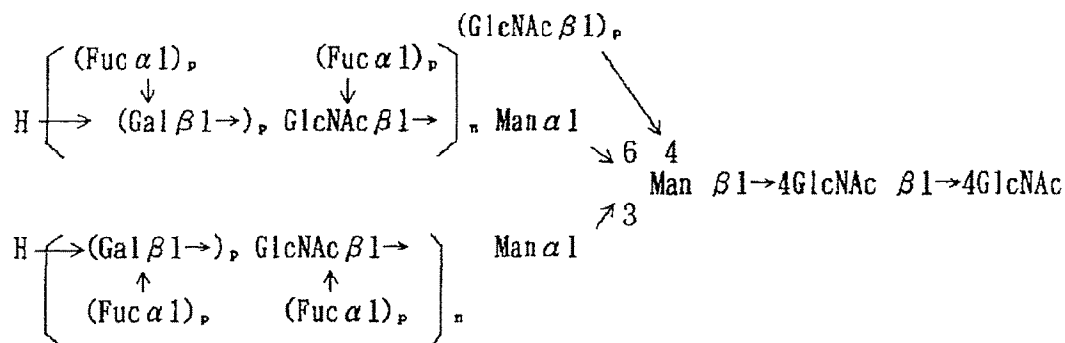


R は H、GlcNAc、又は (GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  6)<sub>p</sub>、(GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  3)<sub>p</sub>Gal

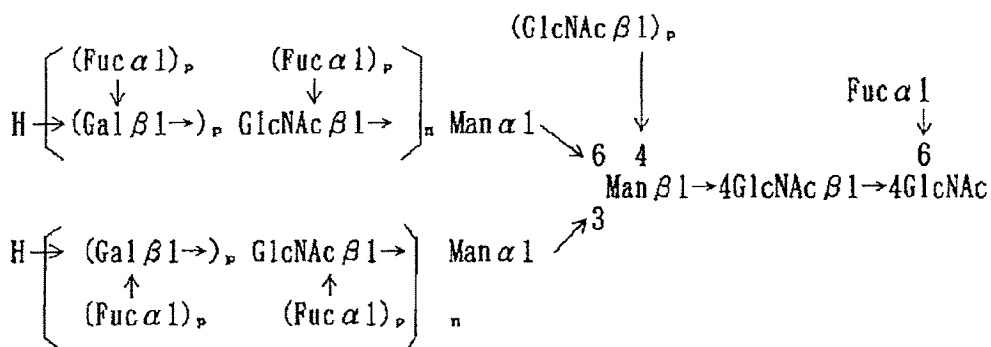
(p は 0 又は 1 である。)



(kは1～5であり、pはそれぞれ独立に0又は1である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)



(pはそれぞれ独立に0又は1であり、nはそれぞれ独立に0～3である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。また、式中右側の  $4GlcNAc \beta 1 \rightarrow 4GlcNAc$  で示した2つのGlcNAc残基はそれぞれ独立にあってもなくてもよい。)



(pはそれぞれ独立に0又は1であり、nはそれぞれ独立に0～3である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。また、式中右側の  $4GlcNAc \beta 1 \rightarrow 4GlcNAc$  で示した2つのGlcNAc残基はそれぞれ独立にあってもなくてもよい。)

本発明で用いるオリゴ糖は好ましくは、オリゴマンノースであり、特に好ましくはマンノペンタオース又はマンノトリオースである。

上記のオリゴ糖は、いずれも1個の還元末端アルデヒド基を有する。そこで、このアルデヒド基を、オリゴ糖をリポソーム表面に導入するための手段として使用することができる。すなわち、このアルデヒドと、アミノ基を有する脂質との間に反応によりシッフ塩基を形成し、次にこのシッフ塩基を、常法に従って、還元、好ましくは化学還元、例えば $\text{NaBH}_3\text{CN}$ により還元することにより、オリゴ糖と、脂質とを結合することができる（水落次男、糖質工学、224-232頁、産業調査会バイオテクノロジー情報センター、1992）。

上記のアミノ基を有する脂質は、好ましくはアミノ基を有するリン脂質であり、例えばホスファチジルアミン、例えばジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）等を使用することができる。上記のようにして得られた、オリゴ糖と脂質との結合物を、本発明においては人工糖脂質と称する場合がある。

リポソームを構成する脂質としては、リポソームを構成するために知られている任意の常用の脂質を単独で又は複数組み合わせ使用することができる。例えば、天然物、例えば卵黄、大豆、又はその他の動植物から得られる脂質、これらの脂質を修飾したもの、例えば水素添加によって不飽和度を低下したもの、あるいは化学合成したものを使用することができる。具体的には、例えば、ステロール類、例えばコレステロール（Chol）；ホスファチジルエタノールアミン類、例えばジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）；ホスファチジルコリン類、例えばジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）；ホスファチジルセリン類、例えばジパルミトイルホスファチジルセリン（DPPS）、ジステアロイルホスファチジルセリン（DSPS）；ホスファチジン酸類、例えばジパルミトイルホスファチジン酸（DPPA）、ジステアロイルホスファチジン酸（DSPA）、等が挙げられる。

リポソームの作製は公知の方法 [D. W. Deamer, P. S. Uster, "Liposome" ed. by M. J. Ostro, Marcel Dekker Inc., N. Y. Basel, 1983, p27] を用いて行うことができる。ボルテックス法および超音波法が一般的であるが、そのほかにエタノール注入法、エーテル法および逆相蒸発法などが適用でき、これらを組合せて使用することもできる。

例えば、ボルテックス法および超音波法においては、所定の脂質を有機溶剤、例えばメタノール、エタノール、クロロホルム又はこれらの混合物、例えばメタノールとクロロホルムとの混合物に溶解した後、該有機溶剤を蒸発除去することにより脂質の薄層を得る。次に、この脂質の薄層に水性媒体を加えてボルテックス処理又は超音波処理することによりリポソームが形成される。この際に、上記水性媒体に、薬物、マーカ―または造影剤などの投与物質を混入、例えば溶解又は懸濁させておくことにより、該投与物質をリポソームに封入することができる。

オリゴ糖をリポソームの表面に導入するためには、例えば、次の2つの方法のいずれかを用いればよい。前記の人工糖脂質が水溶性で有機溶剤に十分溶解しない場合、例えば、前記のM5とDPPEとの結合物(M5-DPPE)、RNとDPPEとの結合物(RN-DPPE)を用いる場合には、これらの水性溶液を調製し、これを形成されたリポソームと混合して、例えば4℃ないし室温において24～120時間、例えば約72時間インキュベーションすればよい。

他方、人工糖脂質が有機溶剤に溶解する場合には、該人工糖脂質を、リポソーム構成用脂質と共に、リポソーム製造過程において前記のごとき有機溶剤に溶解し、以後、常法に従ってリポソームを形成すればよい。リポソームの量に対するオリゴ糖の量はオリゴ糖の種類、封入しようとする抗原の種類、リポソームの組合せ構造等により異なるが、一般に、リポソームを構成する脂質1mgに対して5 $\mu$ g～500 $\mu$ gである。

本発明で用いるリポソームは、多重層タイプ (multilamella vesicle) であってもよく、また単層タイプ (unilamella vesicle) であってもよい。これらは既知の常法に従って調製することができ、また常法に従って一方のタイプを他方の

タイプに、例えば多重層タイプのリポソームを単層タイプのリポソームに転換することもできる。本発明で用いるリポソームの粒径は特に限定されないが、必要により常法に従って、例えば所望の孔サイズのフィルターにより濾過することにより、粒径を整えることができる。

本発明で用いる投与物質は、好ましくは、薬物、マーカー、または造影剤である。薬物としては、抗癌剤、癌ワクチン、抗原ペプチド、免疫活性化剤（ピシバニールなど）、サイトカイン、血管新生阻害剤などが挙げられる。

本発明で用いることができる抗癌剤の種類は特に限定されず、アルキル化薬（例えば、シクロホスファミド、塩酸ニムスチン、イホスファミド、ラニムスチン、チオテパ、メルファラン、ブスルファン、ダカルバジン、カルボコン、塩酸プロカルバジンなど）、代謝拮抗薬（例えば、シタラビン、テガフル、シタラビンオクホスファート、エノシタビン、リン酸フルダラビン、レボホリナートカルシウム、塩酸ゲムシタビン、メトトレキサート、メルカプトプリン、カルモフル、6-メルカプトプリンリボシド、ヒドロキシカルバミド、フルオロウラシル、ホリナートカルシウム、ドキシフルリジンなど）、分子標的治療薬（チロシンキナーゼ阻害薬）又はアルカロイド（硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンデシン、硫酸ビンブラスチンなど）が挙げられる。

マーカーとしては、GFPなどの蛍光タンパク質、フルオロ・デオキシ・グルコースなどが挙げられる。また、造影剤としては、非イオン性水溶性ヨード造影剤、水溶性ヨード造影剤、低浸透圧水溶性ヨード造影剤などが挙げられる。

リポソームの量に対する投与物質の量は、投与したリポソーム組成物が腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達されるという本発明の効果が得られる限り特に限定されず、投与物質の種類やリポソームの組成や構造等により適宜設定することができる。一般的には、投与物質の量は、リポソームを構成する脂質1mg当たり1 $\mu$ g～100 $\mu$ gである。

本発明のリポソーム組成物は、所望により薬学的に許容される担体を含んでもよい。担体としては、滅菌水、緩衝液又は食塩水を用いることができる。ま

た、本発明のリポソーム組成物は、所望により塩類、糖類、蛋白質、澱粉、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコール等を含んでいてもよい。

本発明のリポソーム組成物の投与経路は特に限定されないが、好ましくは腹腔内に投与することができる。本発明のリポソーム組成物の投与量は、投与物質の種類、投与経路、症状の重篤度、患者の年齢および状態、副作用の程度等により変動するが、一般に、 $0.1 \sim 100 \text{ mg/kg}$  /日の範囲である。

本発明のリポソーム組成物を投与する場合、磁性化合物を封入したオリゴ糖被覆リポソームと一緒に組み合わせて投与することもできる。本発明で用いる磁性化合物としては、磁界下で発熱または振動をするような磁性微粒子を用いることが好ましい。この場合、オリゴ糖被覆リポソームと抗癌剤とを含むリポソーム組成物と、オリゴ糖被覆リポソームと磁性化合物とを含むリポソーム組成物とを混合して得られる混合物を生体に投与することができる。この場合、大網に取り込まれた当該リポソーム組成物を貪食したマクロファージから、外部磁場をかけることにより抗癌剤を放出させることができ、これにより、この部位に転移している腫瘍組織を効率的に抑制することが可能になる。

次に本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物の利用方法について説明する。

(1) 腹腔内マクロファージを運び屋とした、腹腔内節外性リンパ組織への抗癌剤のドラッグデリバリーシステム

M3 リポソーム (FITC-BSA を封入) を腹腔内に投与すると、時間経過にともない大網及び腸管膜リンパ組織 (乳斑) へ集積してくる。腹腔内の免疫系を破綻させたマウスでは、リポソームが脾臓へ一部送達されるが、そうでない場合には、脾臓に存在するマクロファージへの取り込みはほとんど見られない。ゆえに、このリポソームに抗癌剤を封入すると、腹腔内リンパ節に生じた転移初期病変に抗癌剤を集積して働かせることが可能となる。有効な抗癌剤は、強い副作用を持つことが多く、この点を改善するために種々のドラッグデリバリーシステムが考案されている。抗腫瘍効果は一般に腫瘍内の薬剤濃度に依存しているので、

M3 リポソームを用いることで腫瘍局所に集積できる技術は、抗癌剤デリバリーシステムとして広く利用できる。本発明のシステムは、以下の3つの免疫学的機序に基づくステップに基づいている。

(i) 表面にマンノースを抱合したM3 リポソームは、会合したマクロファージによって特異的、迅速に貪食されリソソームへ蓄積される。

(i i) マンノース受容体を介した細胞内取り込みは、マクロファージを活性化する。この活性化によって、マクロファージは抗原提示するために領域リンパ節辺縁洞に集積する。

(i i i) リンパ節に到達したマクロファージは、リソソームで消化しきれないものを接着面細胞外へ排出する。

この方法を用いることで、効率よく高濃度の抗癌剤を腫瘍局所に集積でき、集積後は長時間にわたり緩やかに抗癌剤がマクロファージから排出されることで、腫瘍局所のみを長時間抗癌剤に曝露させることが可能である。さらに集積したマクロファージに熱等のコントロールされたストレスを体外から与えることで、積極的かつ能動的に排出させることができる。

## (2) 腹腔内マクロファージを運び屋とした、腹腔内節外性リンパ組織へのがんワクチンデリバリーシステム

オリゴマンノース被覆リポソームの使用は、癌ワクチンにも応用できる技術である。癌ワクチンの効果は、いかに効率よく癌抗原を抗原提示細胞に抗原情報をインプットし、より効果的に癌細胞を攻撃させる免疫活性を誘導できるかという点が重要であると考えられている。この点において、オリゴマンノース被覆リポソームに癌抗原と免疫賦活剤を封入し、腹腔内に散布すると、これらの薬剤はマクロファージによって送達され、癌の転移巣となる領域リンパ組織に到達し、局所での免疫活性を亢進させることができる。これまでの癌免疫療法で問題となっていた、免疫反応の活性化が不十分であったことによるワクチンの効果の弱さは、癌病巣局所での抗腫瘍免疫活性化によって改善することができる。

### (3) 蛍光物質などを封入したオリゴマンノース被覆リポソームによる初期腹腔内転移危険部位の検出

R T - P C R法を用いた高感度の検出法によって腹腔内遊離癌細胞の存在が確かめられ、腹膜微小転移の可能性が高いと判断された場合でも生存率は50%程度である。このことは、腹膜微小転移局所の特定ができずにいることと無関係ではない。オリゴマンノース被覆リポソームを取り込んだマクロファージの集積場所と癌細胞の微小転移の生じる場所が同じであるという事実から、蛍光タンパク質などを術中でも認識容易な物質を封入したリポソームを術前24時間前に投与することにより腹膜微小転移の高発部位を検出することが可能であり、予防的に最小限の侵襲で切除することが可能となる。

### (4) 他の応用

#### (A) 癌リンパ節転移に対する治療への応用

近年増加している乳癌では、リンパ節転移が患者予後に大きく影響する一方、広範なリンパ節廓清でも予後が改善されないことが理由となり、主たる治療法は縮小手術と化学療法との組み合わせに移行しつつある。乳癌では、腋下、鎖骨上窩、傍胸骨リンパ節を領域リンパ節としているので、これらからの再発が間々みられる。抗癌剤を入れたM3リポソーム、もしくは癌免疫療法として癌抗原と免疫賦活剤を入れたM3リポソームを、手術後病巣近傍へ注入することで、マクロファージにより領域リンパ節への効果的な薬剤送達が期待され、薬物療法のさらなる効果が期待される。この他にも同様の機序に基づいて、リンパ節好転移癌であるメラノーマ、甲状腺癌、肺癌の治療にも適応できる。

#### (B) 血液系腫瘍への適応

血液系腫瘍では、単核球、マクロファージ系の分化を示す腫瘍が治療適応対象となる。本発明のM3リポソームに入れた抗癌剤を分子標的性の高いものとすれば、腫瘍以外のマクロファージに取り込まれた場合でも、副作用を軽減することができ、腫瘍細胞に限った薬効を期待できる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によ

って限定されるものではない。

## 実施例

実施例 1: オリゴ糖被覆リポソームの製造方法および薬物、マーカ―又はまたは、造影剤の封入方法

以下の方法により、マンノペンタオース (M5) (化 1 に示した化合物) 又はマンノトリオース (M3) ( $\text{Man} \alpha 1 \rightarrow 6$  ( $\text{Man} \alpha 1 \rightarrow 3$ )  $\text{Man}$  という構造を有するマンノトリオース ( $\text{Man} 3$ )) と、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) とを還元アミノ化反応で化学的に結合させ M5-DPPE および M3-DPPE を合成した。

先ず、マンノペンタオース (M5) 又はマンノトリオース (M3) 2.5 mg に 600  $\mu\text{l}$  の蒸留水を加えて攪拌溶解してオリゴ糖溶液を調製した。次に、クロロホルム/メタノール (1:1、体積比) 混合液に DPPE を 5 mg/ml の濃度で溶解して DPPE 溶液を調製した。また、メタノールに、 $\text{NaBH}_3\text{CN}$  を 10 mg/ml の濃度に溶解して  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  溶液を調製した。前記オリゴ糖の各溶液 600  $\mu\text{l}$  に前記 DPPE 溶液 9.4 ml および前記  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  溶液 1 ml を加えて攪拌混合した。この反応混合液を 60℃ にて 16 時間インキュベートし、人工糖脂質を生成せしめた。合成した人工糖脂質は HPLC を用い高純度に精製した。

TRITC で標識されたタンパク質 (実施例 2) 又は FITC あるいはローダミンで標識されたタンパク質 (実施例 3) を封入したリポソームは、以下のようにして作製した。

先ず、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、コレステロールおよび人工糖脂質 (M5-DPPE または M3-DPPE) を 1:1:0.1 で混合したクロロホルム/メタノール溶液もしくはエタノール溶液をなし型フラスコにいれ、ロータリーエバポレーターで減圧乾固し脂質フィルムを作製した。次いで、TRITC で標識されたタンパク質 (実施例 2) 又は FITC あるいはローダミンで標識されたタンパク質 (実施例 3) を含む PBS 溶液 (5 mg/ml) 0.3 ml を脂質フィルムに加え、ボルテック

スミキサーを用いて激しく攪拌し、M5-DPPE 被覆リポソームまたは M3-DPPE 被覆リポソームを作製した。TRITC で標識されたタンパク質又は FITC あるいはローダミンで標識されたタンパク質としては、FITC-BSA または TRITC-BSA を使用した。

その後、リポソームを PBS で数回洗浄し、リポソームに封入されていない可溶性の物質を遠心により取り除いた。さらにこのリポソームの粒径を  $1\mu\text{m}$  のフィルターを用いて整えた。封入タンパク質量はタンパク質量により、またリポソームの脂質組成比および薬物は HPLC によって定量した。

#### 実施例 2：マクロファージへの取り込みの評価方法と簡単な結果の説明

TRITC で標識された BSA を封入した M5-DPPE 被覆リポソームまたは M3-DPPE 被覆リポソーム（コレステロールとして 100 マイクログラム）をマウス腹腔内に投与し、30 分、60 分、120 分、180 分後に腹腔内細胞を常法により回収した。回収した細胞を FITC で標識された抗 CD 11c 抗体あるいは F4/80 で染色し、その後 FACS を用いて細胞に取り込まれたローダミンおよび細胞表面抗原 (FITC) の蛍光強度を解析した。

図 1 は M3-DPPE 被覆リポソームと M3-DPPE で被覆していないリポソームを投与し 1 時間後に細胞を回収し腹腔内細胞への取込みを観察したものである。M3-DPPE 被覆リポソームを投与した場合マクロファージのマーカーである F4/80 で染色される細胞の 78% が TRITC の強い蛍光を持っていることから、マクロファージに TRITC で標識されたタンパク質を封入した M3-DPPE 被覆リポソームが取り込まれたことが分かる。一方 M3-DPPE で被覆していないリポソームを投与した場合はほとんど取込みが見られない。図 1 下段で示したように M3-DPPE 被覆リポソームはマクロファージに顆粒状に取り込まれている。

#### 実施例 3：マクロファージまたはリポソームの標的部位への集積の評価方法と簡単な説明

FITC あるいはローダミンで標識されたタンパク質を封入した M3-DPPE 被覆リポ

ゾーム 100 マイクログラム（コレステロール換算）を生理食塩水で希釈し、総量 0.5 ミリリットルをヌードマウス腹腔内に接種した。その後、経時的（3 時間、6 時間、12 時間、24 時間後）にマウスを屠殺し、観察した。マウスを開腹後、青色光（150W ハロゲン光源，LGPS-2 に 420-480 の band pass filter を装着したもの）をマウス腹腔内の大網を含む上腹部に照射し、黄色の filter（500nm 以上の波長域の可視光を通す long pass filter）を装着した実体顕微鏡（オリンパス GFP 専用チェッカー，SZ40-GFP）下に暗視野で大網への M3 リポゾームの集積を緑色（FITC）としてデジタルカメラを介してパソコンに取り込み評価した。

ローダミンの場合、150W ハロゲン光源に、バンドパスフィルター 545-580 を用い、吸収フィルターとしてロングパスフィルター（590 nm 以上）を用いて観察した。

図 2 は大網への M3-DPPE 被覆リポソームの集積を経時的にみたものである。3 時間後にはすでに集積が認められ、12 時間後に最大集積を示し、その後 24 時間まで集積が認められた。節外性リンパ組織が低形成である  $\gamma\delta$ T 細胞欠失マウスではほとんど集積が認められないことから、M3-DPPE 被覆リポソームが節外性リンパ組織に集積していることが分かる。一方 M3-DPPE で被覆していないリポソームでは集積はほとんど見られなかった。

#### 実施例 4：抗癌剤封入リポソームと磁性微粒子封入リポソームによる胃がん腹膜転移の制癌効果確認実験

（1）抗癌剤封入糖鎖被覆リポソームと磁性微粒子封入糖鎖被覆リポソームの混合投与による大網へのリポソーム集積

抗癌剤封入糖鎖被覆リポソーム（120  $\mu$ g/ml of 5FU, 2 mg/ml of cholesterol）および磁性微粒子封入糖鎖被覆リポソーム（1.5 mg/ml of magnetite, 2 mg/ml of cholesterol）をそれぞれ調整し、以下に示す比率で混合し、マウス腹腔内に投与した。24 時間後、マウスより大網を摘出し、そこに含まれる 5FU および鉄イオンを測定した（図 3）。

A：240  $\mu$ g のコレステロールを含む M3/5-FU

20  $\mu$ g のコレステロールを含む M3/ML

B : 320  $\mu$ g のコレステロールを含む M3/5-FU

40  $\mu$ g のコレステロールを含む M3/ML

C : 480  $\mu$ g のコレステロールを含む M3/5-FU

20  $\mu$ g のコレステロールを含む M3/ML

D : 480  $\mu$ g のコレステロールを含む M3/5-FU

40  $\mu$ g のコレステロールを含む M3/ML

5-FU 濃度 : 120  $\mu$ g/ml ; M3/ML 濃度 : 1.5mg/ml ; コレステロール : 2mg/ml

その結果、抗癌剤封入糖鎖被覆リポソームを 240  $\mu$ g cholesterol、磁性微粒子封入糖鎖被覆リポソームを 20  $\mu$ g cholesterol で混合して投与した場合がもっとも集積効率がよいことが判明した。

(2) 上記条件検討ののち、制癌効果の検討を行った。

まず、GFP を導入した胃がん細胞株 MKN 28 を  $3 \times 10^6$  ノードマウスの腹腔に投与した。24 時間後 GFP の蛍光を指標として癌細胞の生着を確認し、生着が確認されたマウスの腹腔に抗癌剤封入糖鎖被覆リポソームを 240  $\mu$ g cholesterol、磁性微粒子封入糖鎖被覆リポソームを 20  $\mu$ g cholesterol で混合して投与した。リポソームを投与 24 時間後、交盤磁界照射装置（第一高周波製）、高周波誘導加熱装置（富士電波工機株式会社製。型式 F1H-153HH、出力 : 15Kw、400KHz）で 30 分間交盤磁界照射を行った。その後 1 週間経過した後、マウスを開腹しがんの増殖を GFP の蛍光を指標に観察すると共に、腫瘍の重量を測定した。上記の方法及び結果を図 4～図 6 に示す。腫瘍重量は、対照マウスでは 36.6 mg であったのに対し、抗癌剤（5FU）で処置したマウスでは 5.2 mg であり、本発明のリポソーム組成物の投与により腫瘍重量は顕著に抑制された。また、GFP の蛍光観察からも抗癌剤（5FU）で処置したマウスではがんの増殖は抑制されていた。

## 産業上の利用可能性

本発明により、抗癌剤などの投与物質を標的部位に効率良く集積させ、放出させることができるドラッグデリバリーリポソーム組成物を提供することが可能になった。

## 請求の範囲

1. オリゴ糖被覆リポソームと投与物質とを含む、投与物質を標的部位に送達するためのドラッグデリバリーリポソーム組成物。
2. オリゴ糖がオリゴマンノースである、請求項1に記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。
3. オリゴ糖がマンノペンタオース又はマンノトリオースである、請求項1又は2に記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。
4. 投与物質が、薬物、マーカ―または造影剤である、請求項1から3の何れかに記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。
5. 薬物が抗癌剤である、請求項4に記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。
6. 腹腔内に投与され、腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達される、請求項1から5の何れかに記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。
7. 標的部位が、腹腔内の癌の初期腹腔内転移病巣である大網又は腸管膜の節外性小リンパ節である、請求項1から6の何れかに記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。
8. 磁性化合物を封入したオリゴ糖被覆リポソームと一緒に組み合わせて投与される、請求項1から7の何れかに記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。

## 要約書

本発明の目的は、抗癌剤などの投与物質を標的部位に効率良く集積させることができるドラッグデリバリー組成物を提供することである。本発明によれば、オリゴ糖被覆リポソームと投与物質とを含む、投与物質を標的部位に送達するためのドラッグデリバリーリポソーム組成物が提供される。

図 1

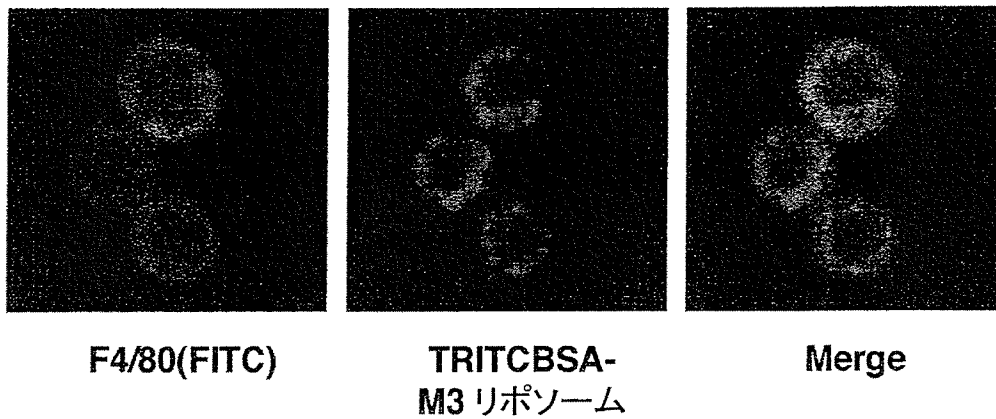
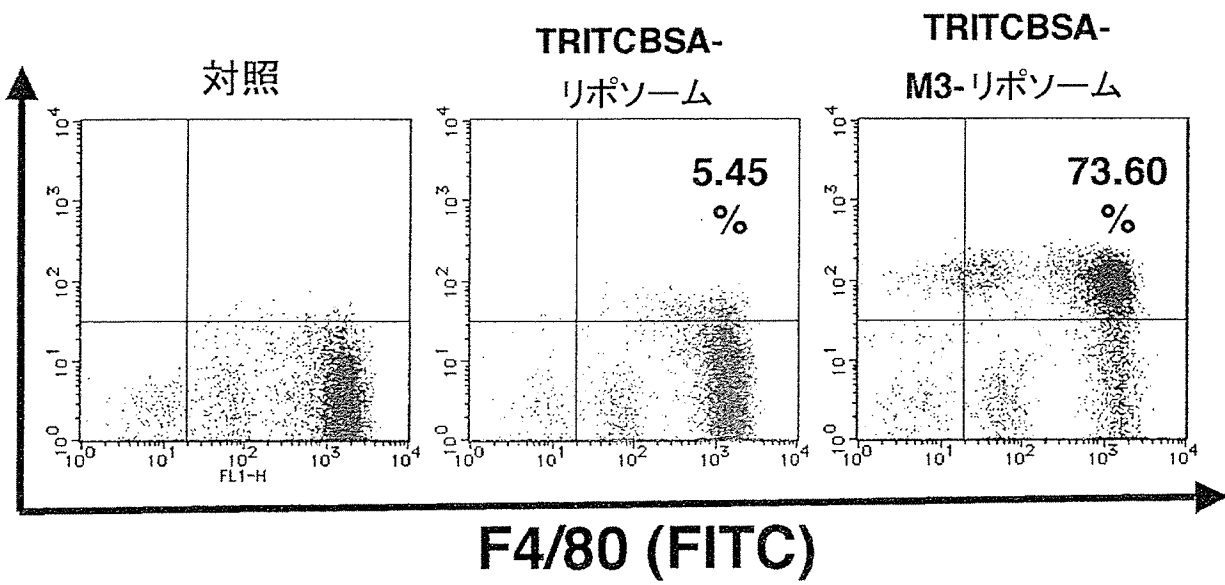


図 2

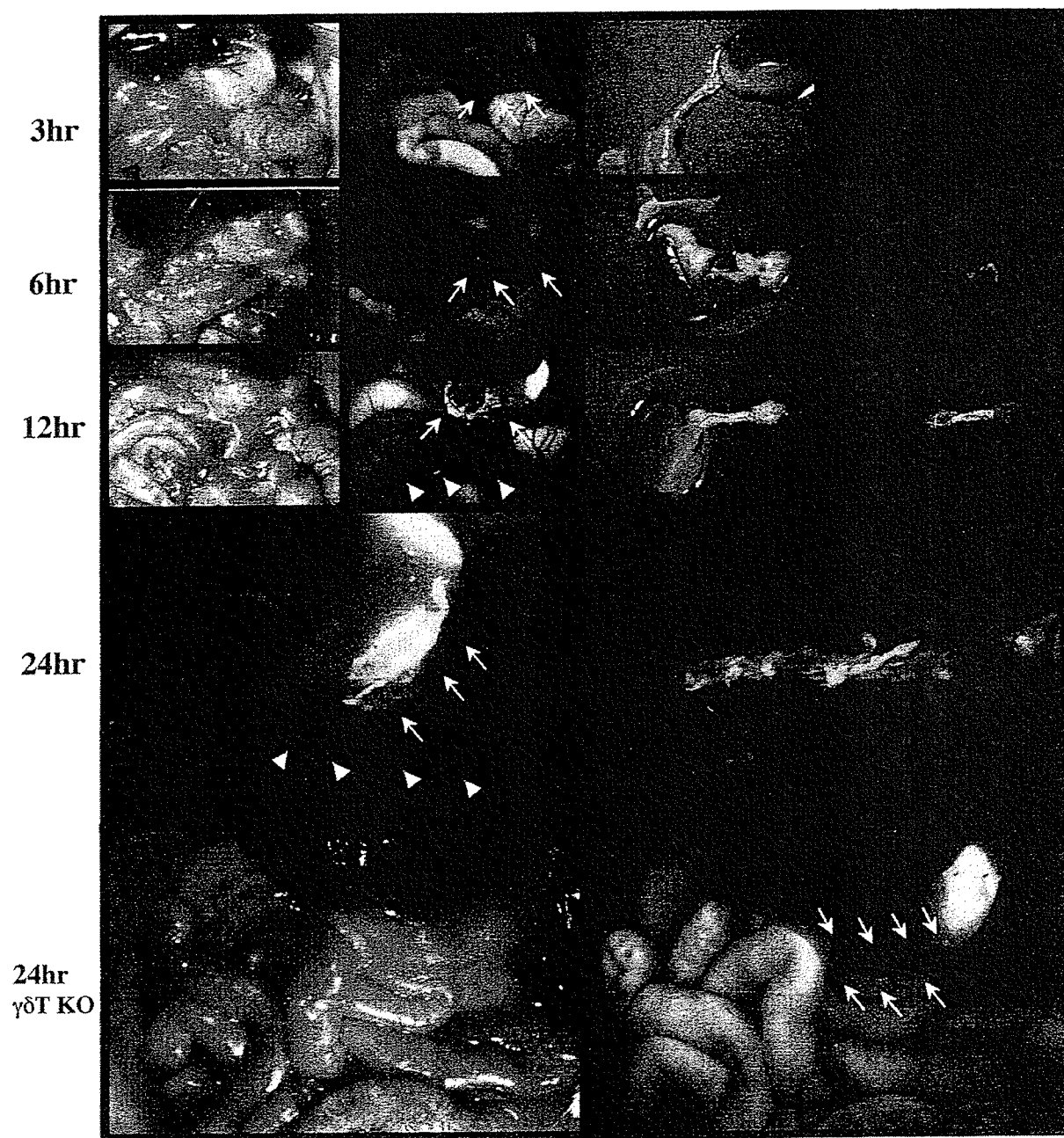


図 3

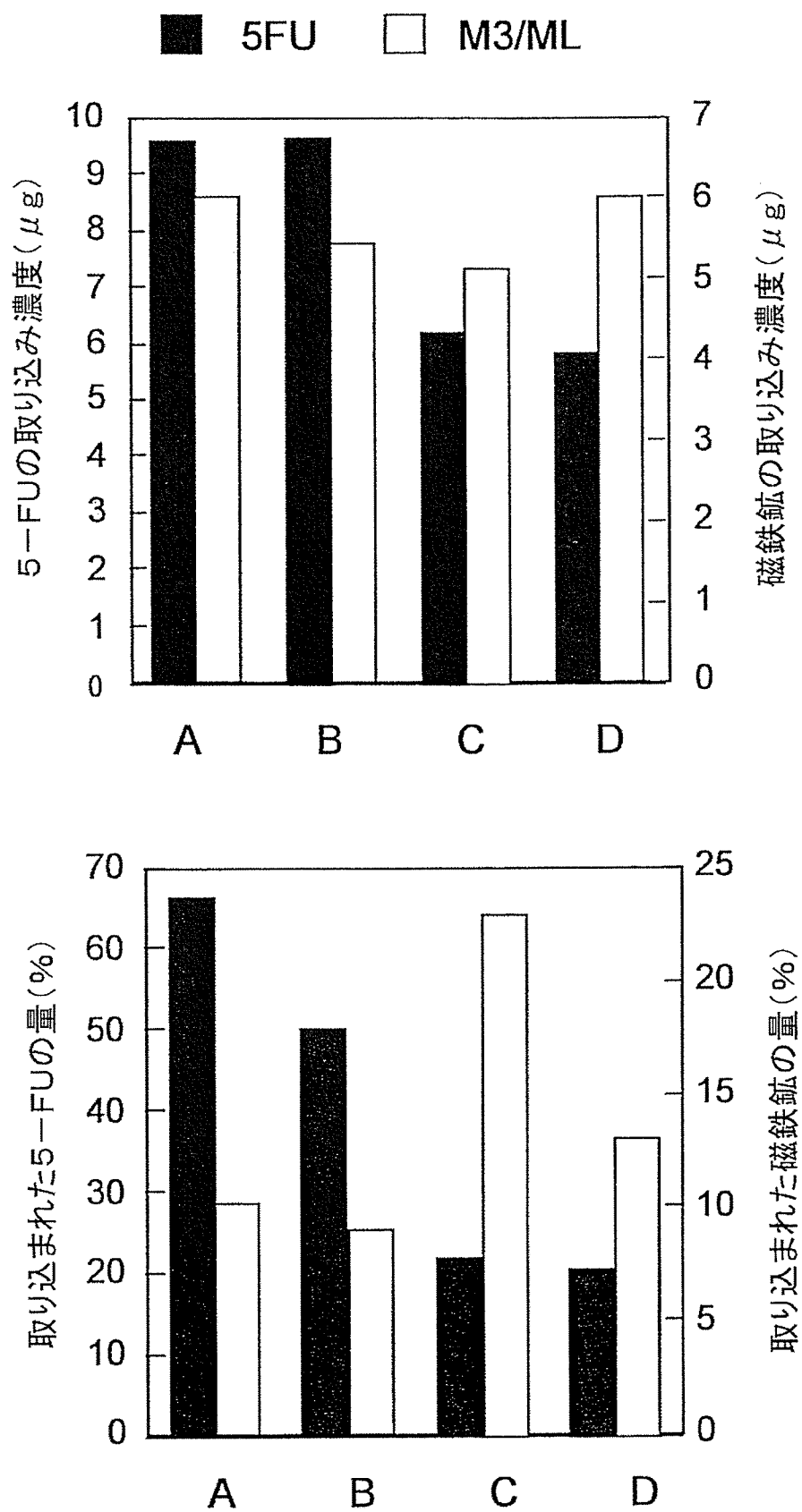


图 4

5FU/MCL 处理  
(5FU, 14.4  $\mu\text{g}$ )



对照

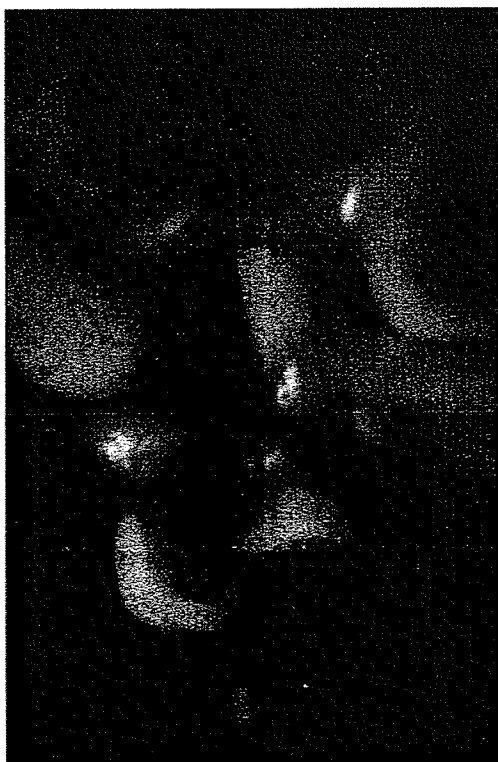


図 5

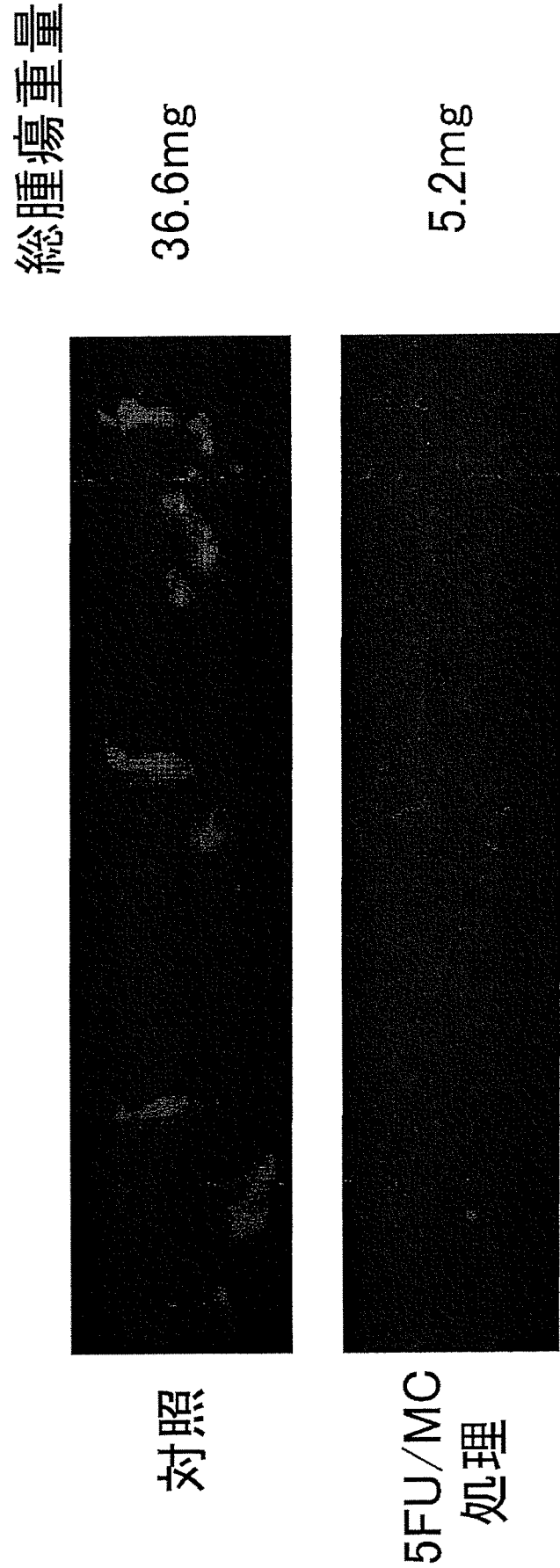
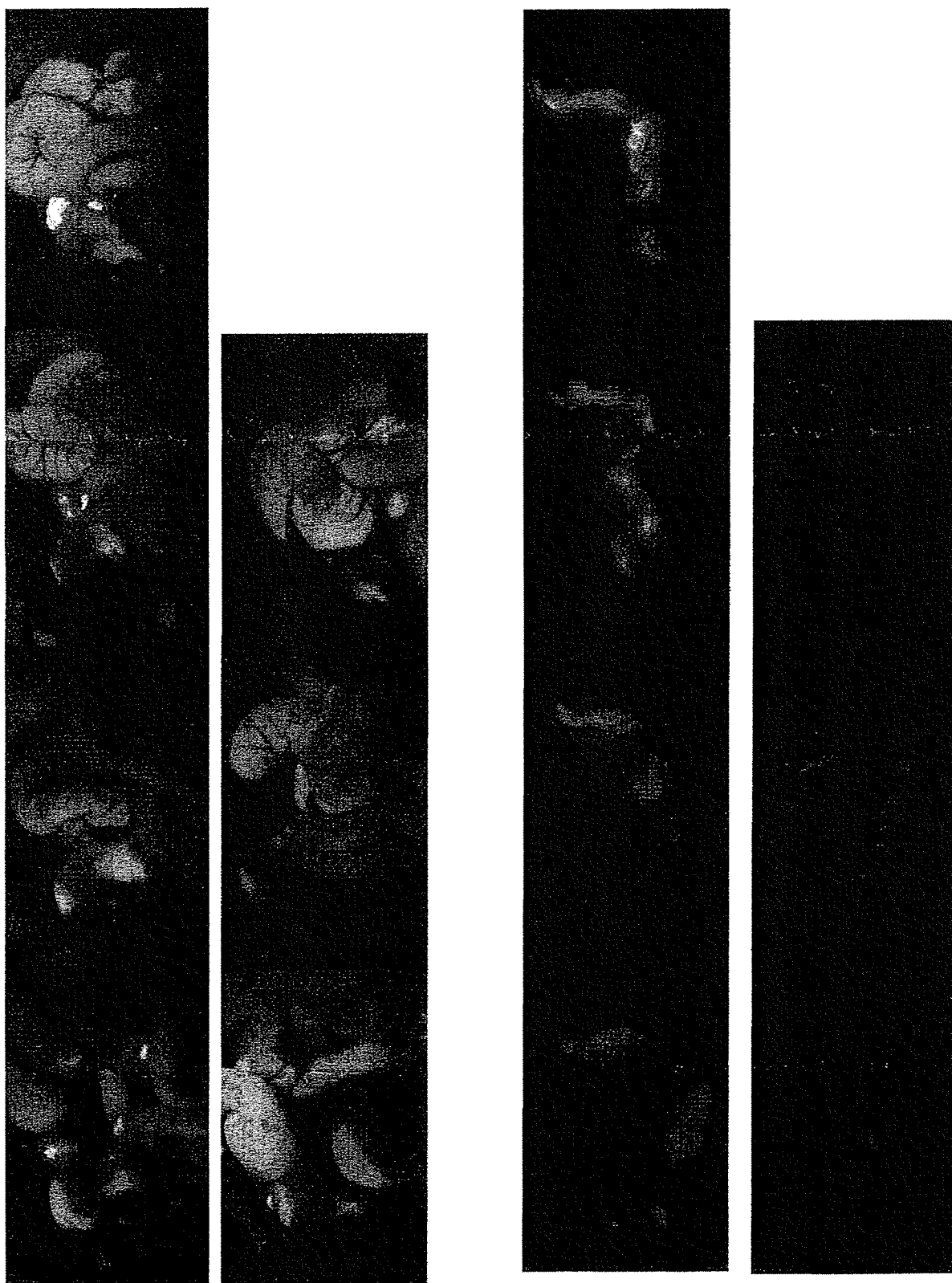


図 6



対照

5FU

対照

5FU